

Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.
11. Jg. 1973, S. 263—269

Halbwertszeit von $[4-^{14}\text{C}]$ Östradiol- 17β in vivo sowie Stoffwechsel von $[4-^{14}\text{C}]$ Östron und $[4-^{14}\text{C}]$ Östriol in vitro bei Lebergesunden und bei Patienten mit Lebercirrhose¹⁾

Von J. BREUER und H. BREUER

Institut für Klinische Biochemie und Klinische Chemie der Universität Bonn

(Eingegangen am 4. April/16. Mai 1973)

Herrn Professor Dr. Dr. Ernst Schütte zum 65. Geburtstag gewidmet

Bei 13 männlichen Patienten mit Lebercirrhose und 5 männlichen lebergesunden Vergleichspersonen wurde die biologische Halbwertszeit von $[4-^{14}\text{C}]$ Östradiol- 17β im Plasma bestimmt. Die mittlere Halbwertszeit von $[4-^{14}\text{C}]$ Östradiol- 17β betrug bei den Lebercirrhotikern 165 min (Schwankungen zwischen 100 und 247 min) und bei den Lebergesunden 120 min (Schwankungen zwischen 60 und 200 min). Diese Differenz konnte statistisch nicht gesichert werden. Es bestanden keine Korrelationen zwischen der Länge der Halbwertszeit einerseits und klinischen, histologischen und klinisch-chemischen Parametern andererseits.

Während der Inkubation von $[4-^{14}\text{C}]$ Östron mit der Mikrosomen-Fraktion der Leber in Gegenwart von NADPH wurde bei Lebercirrhotikern doppelt soviel $[4-^{14}\text{C}]$ Östradiol- 17β gebildet wie bei Lebergesunden. Die Bildungsrate von wasserlöslichen und insbesondere von proteingebundenen Metaboliten aus $[4-^{14}\text{C}]$ Östron war in der Mikrosomen-Fraktion der cirrhotischen Leber deutlich geringer als in derjenigen der gesunden Leber. Die Hydroxylierung von $[4-^{14}\text{C}]$ Östron zu $[4-^{14}\text{C}]$ Östriol in Gegenwart von NADPH sowie die Konjugierung von $[4-^{14}\text{C}]$ Östriol zu $[4-^{14}\text{C}]$ Östriol- 16α -monoglucuronid in Gegenwart von UDPGlcUA waren in den Mikrosomen-Fraktionen der cirrhotischen Leber und der gesunden Leber etwa gleich groß. $[4-^{14}\text{C}]$ Östron wurde in Gegenwart von NADPH durch die Cytosol-Fraktion der cirrhotischen Leber in geringerem Umfange zu $[4-^{14}\text{C}]$ Östradiol- 17β reduziert als durch die Cytosol-Fraktion der gesunden Leber. Auch die Konjugierungsrate von $[4-^{14}\text{C}]$ Östron zu $[4-^{14}\text{C}]$ Östron-3-sulfat durch die Cytosol-Fraktion in Gegenwart von PAPS war bei cirrhotischem Lebergewebe erheblich niedriger als bei gesundem Lebergewebe.

Die eindeutige Tendenz einer verlängerten Halbwertszeit von $[4-^{14}\text{C}]$ Östradiol- 17β in vivo sowie der verringerte Umsatz von $[4-^{14}\text{C}]$ Östron und die insgesamt höhere Bildungsrate von $[4-^{14}\text{C}]$ Östradiol- 17β in vitro machen deutlich, daß die endokrinen Störungen bei Männern mit Lebercirrhose auf biochemisch faßbare Ursachen zurückgeführt werden können.

Half-life of $[4-^{14}\text{C}]$ oestradiol- 17β in vivo, and metabolism of $[4-^{14}\text{C}]$ oestrone and $[4-^{14}\text{C}]$ oestriol in vitro in normal subjects and in patients with liver cirrhosis

The biological half-life of $[4-^{14}\text{C}]$ oestradiol- 17β in plasma was determined in 13 male patients with liver cirrhosis and in 5 male subjects free from liver diseases. The mean half-life of $[4-^{14}\text{C}]$ oestradiol- 17β was 165 min (range 100—247 min) in patients with liver cirrhosis and 120 min (range 60—200 min) in normal subjects. This difference, however, was not statistically significant. No correlations were found between the length of half-life and clinical, histological and biochemical parameters.

When $[4-^{14}\text{C}]$ oestrone was incubated with the microsomal fraction of liver in the presence of NADPH, twice as much $[4-^{14}\text{C}]$ oestradiol- 17β was formed in patients with liver cirrhosis than in normal subjects. The rate of formation of water-soluble and particularly of protein-bound metabolites from $[4-^{14}\text{C}]$ oestrone in the microsomal fraction was significantly smaller in cirrhotic liver than in normal liver. Hydroxylation of $[4-^{14}\text{C}]$ oestrone to $[4-^{14}\text{C}]$ oestriol in the presence of NADPH and conjugation of $[4-^{14}\text{C}]$ oestriol to $[4-^{14}\text{C}]$ oestriol- 16α -monoglucuronide in the presence of UDPGlcUA were similar in the microsomal fractions of cirrhotic liver and of normal liver. Reduction of $[4-^{14}\text{C}]$ oestrone to $[4-^{14}\text{C}]$ oestradiol- 17β in the presence of NADPH was smaller in the cytosol fraction of cirrhotic liver than in that of normal liver. Similarly, the rate of conjugation of $[4-^{14}\text{C}]$ oestrone to $[4-^{14}\text{C}]$ oestrone 3-sulphate by the cytosol fraction in the presence of PAPS was reduced in patients with liver cirrhosis.

The pronounced tendency for a longer half-life for $[4-^{14}\text{C}]$ oestradiol- 17β as well as the reduced metabolism of $[4-^{14}\text{C}]$ oestrone, together with a higher total rate of formation of $[4-^{14}\text{C}]$ oestradiol- 17β , leave no doubt that the endocrine disturbances in male patients with liver cirrhosis can be related to biochemically describable causes.

Bei männlichen Patienten mit Lebercirrhose treten häufig Störungen des endokrinen Systems auf. So wurden in einer kürzlich durchgeführten Studie an insgesamt 183 Patienten mit histologisch gesicherter Lebercirrhose bei 64% der Erkrankten Beeinträchtigungen der Libido und Potenz, bei 34% eine Gynäkomastie und bei 20% Veränderungen des männlichen Behaarungstyps beobachtet (3, 4). Trotz zahlreicher Untersuchungen sind die Ursachen dieser Störungen noch weitgehend unbekannt. Obgleich immer wieder Zusammenhänge zwischen den Feminisierungsersei-

nungen einerseits und dem Stoffwechsel der Östrogene andererseits vermutet worden sind, können nach ADLERCREUTZ (5) aus den bisher vorliegenden Ergebnissen keine eindeutigen Schlußfolgerungen gezogen werden. Auch die Untersuchung der Östrogenausscheidung im Urin von Lebercirrhotikern, die wegen

¹⁾ Auszugsweise vorgetragen von J. BREUER auf dem III. International Congress on Hormonal Steroids, 7.—12. 9. 1970 in Hamburg (1) und auf der gemeinsamen Herbsttagung der Gesellschaft für Biologische Chemie und der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie, 22.—24. 10. 1970 in Bad Neuenahr (2).

des Auftretens von Chromogenen im Urin mit methodischen Schwierigkeiten verbunden ist (6), hat kein einheitliches Bild ergeben (7, 8). Hingegen scheint die Konzentration von Östradiol-17 β im Plasma cirrhosekranker Männer meist erhöht zu sein (9, 10, 11).

Bereits 1944 berichteten RAKOFF et al. (12) über eine verlängerte „Blut-Clearance“ von Östradiol-17 β bei 3 Patienten mit Lebercirrhose. Dagegen fanden SHAVER et al. (13) unter Verwendung von radioaktiv-markiertem Östradiol-17 β keine unterschiedlichen Halbwertszeiten zwischen 7 Normalpersonen und 4 Patienten mit Lebercirrhose; zum gleichen Schluß kamen ALTENBURG und BECKER (14). In diesem Zusammenhang sei darauf hingewiesen, daß nach vorläufigen Mitteilungen die metabolische Clearancerate für Östradiol-17 β bei der Mehrzahl der untersuchten Patienten mit Lebercirrhose erniedrigt ist (10, 11).

Diese widersprüchlichen Befunde veranlaßten uns, die Halbwertszeit von [4-¹⁴C]Östradiol-17 β bei männlichen Lebergesunden und männlichen Lebercirrhotikern unter vergleichbaren Bedingungen zu ermitteln; dabei wurde [4-¹⁴C]Östradiol-17 β im Plasma nach papierchromatographischer Abtrennung bestimmt. Um zu weitergehenden Aussagen zu kommen, wurde außerdem der Stoffwechsel von [4-¹⁴C]Östron und [4-¹⁴C]Östriol unter besonderer Berücksichtigung der Konjugatbildung in den Mikrosomen- und Cytosol-Fractionen der Leber von lebergesunden Vergleichspersonen und Patienten mit Lebercirrhose untersucht. Die hier gewonnenen Ergebnisse bestätigen zusammen mit unseren früheren Beobachtungen über die Bindung von Östradiol-17 β an Plasmaproteine (15) die Feststellung, daß Feminisierungserscheinungen bei männlichen Lebercirrhotikern durch Veränderungen verschiedener Parameter des Östrogenstoffwechsels bedingt sein können.

Methodik

Steroide

[4-¹⁴C]Östradiol-17 β (1,3,5(10)-Östratrien-3,17 β -diol; spez. Aktivität 51,4 mCi/mmol), [6,7-³H₂]Östradiol-17 β (spez. Aktivität 258 mCi/mmol), [4-¹⁴C]Östron (3-Hydroxy-1,3,5(10)-Östratrien-17-on; spez. Aktivität 51,0 mCi/mmol) und [4-¹⁴C]Östriol (1,3,5(10)-Östratrien-3,16 α ,17 β -triol; spez. Aktivität 53 mCi/mmol) wurden vom Radiochemical Centre, Amersham, England, bezogen. Alle radioaktiven Steroide wurden vor den Versuchen papierchromatographisch auf formamidprägniertem Papier mit Monochlorbenzol oder Chloroform als Laufmittel gereinigt; zur Entfernung von Formamidresten wurde nach Elution der Steroide eine Äther-Wasser-Verteilung durchgeführt.

Östron, Östradiol-17 β , Östriol und Östron-3-sulfat (3-Hydroxy-1,3,5(10)-Östratrien-17-on-3-sulfat) wurden von Schering, Berlin, bezogen. Östriol-16 α -monoglucuronid (1,3,5(10)-Östratrien-3,16 α ,17 β -triol-16-yl- β -D-glucopyronuronat) wurde von Professor A. E. KELLIE, Courtauld Institute of Biochemistry, London, zur Verfügung gestellt.

Reagenzien und Lösungsmittel

Alle organischen Lösungsmittel wurden vor Gebrauch destilliert; die verwendeten Reagenzien waren von p. a. Reinheitsgrad (Merck, Darmstadt). 2,5-Diphenyloxazol (PPO), 1,4-Bis-[4-methyl-5-phenyloxazolyl-(2)]benzol (Dimethyl-POPOP) und Hyamin-Lösung (1 mol/l *p*-(Diisobutyl-cres-oxy-äthoxyäthyl)-dimethylbenzylammonium in Methanol) wurde von Packard Instruments, Frankfurt, bezogen.

Cofaktoren

Folgende Cofaktoren wurden verwendet: NADP⁺, ATP und Uridin-5'-diphosphat-glucuronsäure (UDPGlcUA) (Biochemica Boehringer, Mannheim). Das NADPH-generierende System hatte folgende Zusammensetzung: 2 μ mol NADP⁺, 40 μ mol Glucose-6-phosphat und 2,1 U Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (Biochemica Boehringer, Mannheim). 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat (PAPS) wurde nach GREGORY (16) hergestellt; die wäßrige PAPS-Lösung wurde in 2-ml-Portionen bei -20°C aufbewahrt.

Klinisch-chemische Untersuchungen

Die Bestimmungen der Alanin-Aminotransferase (SGPT; EC 2.6.1.2) erfolgte im kinetischen UV-Test bei 366 nm (Biochemica-Test-Combination, Boehringer, Mannheim). Die elektrophoretische Auftrennung der Serumweiß-Fractionen wurde auf Cellulose-Acetat-Folie durchgeführt.

Lebergesunde Vergleichspersonen

Bei den Vergleichspersonen handelte es sich um 6 männliche Patienten (Alter 30–50 Jahre) der Chirurgischen Universitätsklinik Bonn (Direktor Prof. Dr. A. GÜTGEMANN), die wegen Hernien oder Verdacht auf Magengeschwür eingeliefert worden waren. Die Vergleichspersonen hatten normale Leberfunktionen und waren frei von erkennbaren endokrinen Erkrankungen. Bei allen Patienten wurde vor der Operation die Halbwertszeit von [4-¹⁴C]Östradiol-17 β bestimmt; während der Operation wurde bei 5 der 6 Vergleichspersonen Lebergewebe (1–2 g) für Inkubationsversuche entnommen.

Patienten mit Lebercirrhose

Die Untersuchungen wurden an 13 männlichen Patienten (17 bis 50 Jahre) der Chirurgischen Universitätsklinik Bonn (Prof. Dr. A. GÜTGEMANN) und der Chirurgischen Abteilung (Chefarzt: Prof. Dr. H. W. SCHREIBER) des Marienkrankenhauses Hamburg, durchgeführt. Bei allen Patienten war die Lebercirrhose histologisch gesichert. Vor der Operation wurde die Halbwertszeit von [4-¹⁴C]Östradiol-17 β bestimmt. Zur Entlastung des portalen Hochdrucks wurde bei den Patienten eine porto-cavale Anastomose durchgeführt; während der Operation wurde bei 5 der 13 Patienten Lebergewebe (1–2 g) für Inkubationsversuche entnommen.

Bestimmung der Halbwertszeit in vivo

5 μ Ci [4-¹⁴C]Östradiol-17 β (entsprechend 26,5 μ g) wurden in 0,5 ml Äthanol gelöst und mit 4,5 ml physiol. NaCl-Lösung verdünnt. Die steroidhaltige Lösung wurde in eine 10-ml-Ampulle abgefüllt und in einem Autoklaven sterilisiert. Die so vorbereitete Lösung wurde innerhalb von 2 min in eine Cubitalvene injiziert.

15, 30, 60, 120, 240 und 360 min nach Beendigung der Injektion wurden mittels einer Braunüle aus der kontralateralen Cubitalvene 8, 10, 20, 30 und 40 ml Blut entnommen. Das Blut wurde in Zentrifugenröhrchen gegeben, die vorher mit 1–2 Tropfen Heparin-Lösung (20 I. E. Heparin/ml Blut) benetzt worden waren, und sofort 10 min bei 2000 g zentrifugiert.

Aufarbeitung der Plasmaproben

Die Plasmaproben wurden mit einer Pipette genau abgemessen und in dickwandige Reagenzgläser mit Schliff überführt. Diese enthielten jeweils 10 μ g nichtradioaktives Östradiol-17 β und 10 μ g nichtradioaktives Östron sowie 2 nCi [6,7-³H₂]Östradiol-17 β (zur Bestimmung der methodischen Verluste). Die Proben wurden zweimal mit der fünffachen Menge Methylenchlorid extrahiert. Die organische Phase wurde im Rotationsverdampfer abgedampft und der Rückstand in 10 ml 70proz. Methanol aufgenommen. Die methanolische Lösung wurde dreimal mit jeweils 10 ml *n*-Heptan extrahiert und die organische Phase verworfen. Die wäßrig-methanolische Lösung wurde im Rotationsverdampfer eingedampft; der Rückstand wurde in wenig Methanol (20–30 μ l) aufgenommen und auf formamidprägniertem Papier mit Monochlorbenzol als Laufmittel chromatographiert. Zur quanti-

tativen Bestimmung der Östrogen-Fractionen wurden die Steroide mit Methanol von den Chromatogrammen eluiert, nachdem die Positionen von Östradiol-17 β und Östron durch Anfärben authentischer Testverbindungen auf den Randstreifen mit FOLIN-CIOCALTEUS-Reagenz (17) festgestellt worden waren.

Messung der Radioaktivität

Die in Zählröhrchen eingedampften Elutionsrückstände wurden in 12 ml einer Szintillations-Lösung, enthaltend 5 g PPO und 0,3 g Dimethyl-POPOP/l Toluol, aufgenommen; die Radioaktivität wurde unter Verwendung eines externen Standards in einem Tri-Carb-Szintillations-Spektrometer (Packard Modell 3003) gemessen. Da die Elutionsrückstände sowohl [4-¹⁴C] Östradiol-17 β als auch [6,7-³H]₂ Östradiol-17 β enthielten, wurden ¹⁴C und ³H parallel gezählt. Unter den gewählten Meßbedingungen betrug die Zählausebeute 57% für ¹⁴C und 33% für ³H. Alle Ergebnisse wurden auf 100% Wiederfindung korrigiert und die Werte in Imp./min · ml Plasma ausgedrückt.

Berechnung der Halbwertszeit von [4-¹⁴C] Östradiol-17 β

Die korrigierten Werte für Imp./min · ml wurden halblogarithmisch gegen die Zeit der Blutentnahme aufgetragen. Der lineare Anteil der Plasmaaktivitätskurve (Abfall zwischen 120 und 360 min nach Injektion) wurde bis zum Schnittpunkt mit der Ordinate extrapoliert. Die Zeit, nach der die so ermittelte Konzentration um die Hälfte abgenommen hat, wird als Halbwertszeit bezeichnet.

Zellfraktionierung

Das bei der Operation entnommene Lebergewebe wurde mit der Schere zerkleinert und in 0,25 mol/l Rohrzucker-Lösung in einem Glashomogenisator unter Eiskühlung homogenisiert. Das 10proz. Homogenat wurde in einer Spinco-Ultrazentrifuge L-50 15 min bei 1000 g und der Überstand 45 min bei 20000 g zentrifugiert. Zur Abtrennung der Mikrosomen-Fraktion wurde der Überstand 60 min bei 150000 g zentrifugiert. Die Mikrosomen-Fraktion (Sediment) wurde in 0,25 mol/l Rohrzucker-Lösung aufgenommen. Sowohl die Mikrosomen-Fraktion als auch die Cytosol-Fraktion (150000 g-Überstand) wurden unmittelbar nach der Darstellung für die Inkubationsversuche eingesetzt.

Inkubationsbedingungen

Alle Versuche wurden bei 37°C in einem Schüttelthermostaten durchgeführt. Die eingesetzte Menge Mikrosomen- bzw. Cytosol-Fraktion pro Inkubationsansatz entsprach 30 mg Frischgewebe. Die Steroide wurden, in Propylenglykol gelöst (Endkonzentration 0,5%), den Inkubationsansätzen zugesetzt; die Cofaktoren wurden in Puffer zugefügt. Die Endvolumina der Inkubationsansätze betrugen 3,0 ml.

a) Versuche mit der Cytosol-Fraktion und NADPH: 0,4 μ Ci [4-¹⁴C] Östron (entsprechend 2,2 μ g) und 4,0 μ g Östron wurden mit der Cytosol-Fraktion und dem NADPH-generierenden System in 0,06 mol/l Phosphat-Puffer, pH 6,2, 120 min unter Luft inkubiert.

b) Versuche mit der Cytosol-Fraktion und PAPS: 0,4 μ Ci [4-¹⁴C] Östron (entsprechend 2,2 μ g) und 4,0 μ g Östron wurden mit der Cytosol-Fraktion, 24 μ mol ATP, 0,1 ml einer 0,125 mol/l MgSO₄-Lösung, 0,1 ml einer 0,1 mol/l K₂SO₄-Lösung und 0,2 ml einer PAPS-Lösung in 0,1 mol/l Tris-HCl-Puffer, pH 7,8, 180 min unter Luft inkubiert.

c) Versuche mit der Mikrosomen-Fraktion und NADPH: 0,4 μ Ci [4-¹⁴C] Östron (entsprechend 2,2 μ g) und 4,0 μ g Östron wurden mit der Mikrosomen-Fraktion und dem NADPH-generierenden System in 0,06 mol/l Phosphat-Puffer, pH 7,4, 120 min unter Sauerstoff inkubiert.

d) Versuche mit der Mikrosomen-Fraktion und UDPGlUA: 0,4 μ Ci [4-¹⁴C] Östriol (entsprechend 2,2 μ g) und 4,0 μ g Östriol wurden mit der Mikrosomen-Fraktion und 4,8 μ mol UDPGlUA in 0,06 mol/l Phosphat-Puffer, pH 7,4, 120 min unter Luft inkubiert.

Anarbeitung der Inkubationsansätze

Nach Beendigung der Inkubationen wurden die Mischungen mit dem jeweiligen nichtradioaktiven Steroid versetzt und zweimal mit jeweils 10 ml wassergesättigtem Äthylacetat extrahiert (Freie Steroide). Anschließend wurden die wäßrigen Inkubationslösungen mit NaCl gesättigt und zweimal mit jeweils 10 ml wassergesättigtem n-Butanol extrahiert (Konjugierte Steroide). Die wasserlöslichen und proteingebundenen Metaboliten wurden nur in den Versuchen mit der Mikrosomen-Fraktion und dem NADPH-generierenden System gewonnen. Zu diesem Zweck wurden die Lösungen nach Beendigung der Inkubation 15 min bei 150000 g zentrifugiert. Das Sediment enthielt die proteingebundenen Metaboliten. Der Überstand wurde zweimal mit jeweils 10 ml wassergesättigtem Äthylacetat zur Entfernung der freien Steroide extrahiert; im wäßrigen Rückstand befanden sich die wasserlöslichen Metaboliten. Die Äthylacetatextrakte (freie Steroide) und die n-Butanolextrakte (konjugierte Steroide) wurden am Rotationsverdampfer eingedampft und die Rückstände nach Aufnahme in wenig Methanol der Papierchromatographie unterworfen. Aliquote der Sedimente (proteingebundene Metaboliten) und der wäßrigen Rückstände (wasserlösliche Metaboliten) wurden in 0,5 ml der 1 mol/l Hyamin-Lösung aufgenommen; nach Zugabe von 1,5 ml Äthylacetat und 12,0 ml der Szintillationsflüssigkeit wurde die Radioaktivität in einem Tri-Carb-Szintillations-Spektrometer (Packard Modell 3003) gemessen.

Papierchromatographie

a) Freie Steroide: Diese wurden auf formamidimprägniertem Papier (Schleicher & Schüll 2043b Mgl) mit Monochlorbenzol, Chloroform oder Chloroform/Äthylacetat (Volumina 50 ml + 10 ml) als Laufmittel chromatographiert; Einzelheiten vgl. l. c. (18).

b) Konjugierte Steroide: Die Östriolglucuronid-Fraktion wurde im System Äthylacetat/Toluol/n-Hexan/tert. Butanol/Essigsäure/Wasser (Volumina 12 ml + 15 ml + 5 ml + 12 ml + 28 ml), die Östronsulfat-Fraktion im System Essigsäure/Wasser/tert. Butanol/Dichloräthan (Volumina 12 ml + 28 ml + 10 ml + 30 ml) chromatographiert.

Die freien und die konjugierten Steroide wurden durch Messung der Radioaktivität in einem Radiopapierchromatographen (Packard Modell 7200) lokalisiert. Die authentischen Referenzsubstanzen wurden durch Anfärben der Randstreifen mit FOLIN-CIOCALTEUS Reagenz (17) oder Antimontrichlorid in Chloroform (ges. Lösung von SbCl₃ in CHCl₃) (19) sichtbar gemacht. Zur weiteren Charakterisierung wurden die radioaktiven Zonen von den Chromatogrammen mit Methanol eluiert.

Hydrolyse der Steroidkonjugate

Die von den Papierchromatogrammen eluierten Steroidkonjugate wurden in 5 ml Acetat-Puffer, pH 5,2, mit 0,5 ml eines Extraktes aus *Helix pomatia* (L'Industrie Biologique Francaise, Genevilliers, Frankreich), enthaltend 50000 FISHMAN-Einheiten β -Glucuronidase und 25000 WHITEHEAD-Einheiten Sulfatase, 14 h bei 37°C inkubiert. Die freigesetzten Steroide wurden zweimal mit jeweils 10 ml Äther extrahiert. Die vereinigten Ätherextrakte wurden eingedampft und die Rückstände auf formamidimprägniertem Papier mit Monochlorbenzol (zum Nachweis von Östron) bzw. Chloroform/Äthylacetat (Volumina 50 ml + 10 ml) (zum Nachweis von Östriol) chromatographiert.

Eiweißbestimmung

Der Eiweißgehalt der Cytosol- und Mikrosomen-Fractionen wurde nach KJELDAHL (20) bestimmt.

Ergebnisse

Halbwertszeit von [4-¹⁴C] Östradiol-17 β

Zur Bestimmung der Halbwertszeit von [4-¹⁴C] Östradiol-17 β erhielten die Versuchspersonen eine einmalige intravenöse Injektion des Steroids. Wie aus den Kurven der Abbildung 1 hervorgeht, nahmen die Konzen-

trationen von $[4-^{14}\text{C}]$ Östradiol-17 β im Plasma während der ersten 60 min nach Injektion rasch ab; zwischen 120 und 360 min verlangsamte sich der Konzentrationsabfall deutlich. Zur Ermittlung der Halbwertszeit wurden die bei 120 und bei 360 min gemessenen Werte durch eine Gerade miteinander verbunden, die bis zur Ordinate verlängert wurde; aus Gründen der Vereinfachung blieben die bei 240 min gemessenen Werte, die etwas unterhalb der beiden Geraden lagen, unberücksichtigt. Der Schnittpunkt zwischen der Geraden und der Ordinate ist somit in erster Näherung ein Maß für die fiktive Konzentration von $[4-^{14}\text{C}]$ Östradiol-17 β im gesamten, zur Verfügung stehenden Flüssigkeitsraum zum Zeitpunkt der Injektion. Als Halbwertszeit wird in der vorliegenden Untersuchung diejenige Zeit definiert, nach der die erwähnte Konzentration um die Hälfte abgenommen hat. Die obere Kurve in Abbildung 1 zeigt die Abnahme der Konzentration von $[4-^{14}\text{C}]$ Östradiol-17 β bei 13 männlichen Patienten mit Lebercirrhose, die untere Kurve die Abnahme bei 5 männlichen lebergesunden Vergleichspersonen. Während der gesamten Versuchszeit lagen die mittleren Konzentrationen von $[4-^{14}\text{C}]$ Östradiol-17 β im Plasma bei den Lebercirrhosekranken deutlich höher als bei den Lebergesunden.

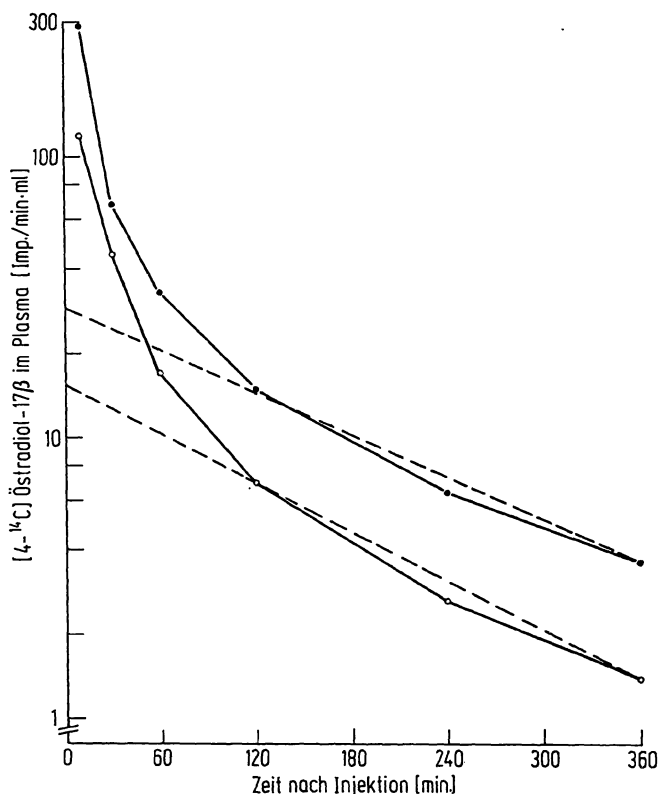


Abb. 1

Zeitlicher Verlauf der Konzentrationsabnahme von $[4-^{14}\text{C}]$ Östradiol-17 β im Plasma von lebergesunden Vergleichspersonen (○—○) und von Patienten mit Lebercirrhose (●—●). Alle Versuchspersonen erhielten eine einmalige intravenöse Injektion von 5 μCi $[4-^{14}\text{C}]$ Östradiol-17 β (spezif. Aktivität 51,4 mCi/mmol). Nach Aufarbeitung der zu verschiedenen Zeiten nach Injektion entnommenen Blutproben wurde $[4-^{14}\text{C}]$ Östradiol-17 β quantitativ bestimmt. Die Punkte der Kurven sind Mittelwerte von 6 männlichen lebergesunden Vergleichspersonen und 13 männlichen Patienten mit Lebercirrhose. Weitere Einzelheiten vgl. Methodik und Ergebnisse

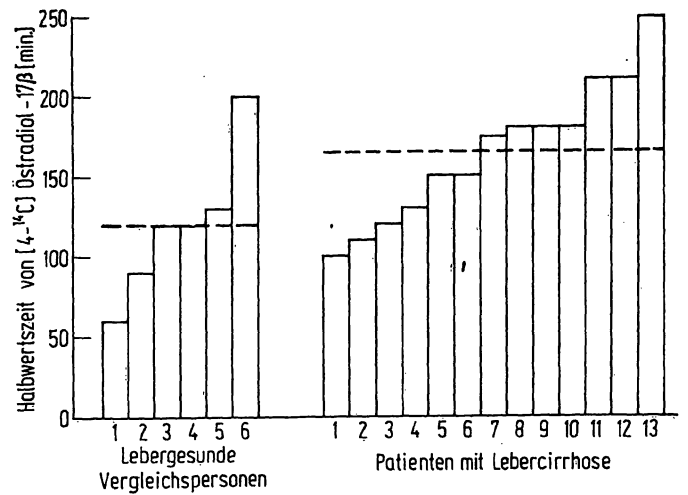


Abb. 2

Halbwertszeit von $[4-^{14}\text{C}]$ Östradiol-17 β bei 6 männlichen lebergesunden Vergleichspersonen und 13 männlichen Patienten mit Lebercirrhose. Die Halbwertszeit wurde nach dem in der Methodik beschriebenen Verfahren berechnet. Die gestrichelten Linien geben die Mittelwerte der Halbwertszeiten für die beiden Gruppen an

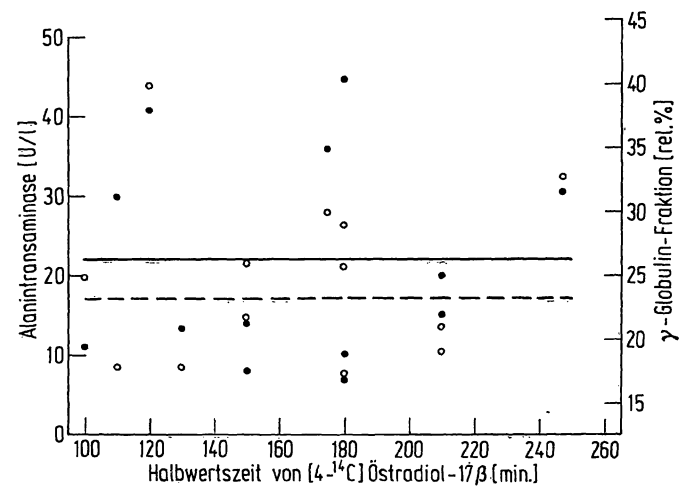


Abb. 3

Aktivität der Alanin-Aminotransferase (SGPT) und Konzentration der γ -Globulin-Fraktion in Abhängigkeit von der Halbwertszeit von $[4-^{14}\text{C}]$ Östradiol-17 β bei 13 männlichen Patienten mit Lebercirrhose
● Aktivität der SGPT in U/l
○ γ -Globulin-Fraktion in rel. %
Durchgezogene Linie: Mittelwert der SGPT-Aktivitäten
Unterbrochene Linie: Mittelwert der Konzentrationen der γ -Globulin-Fraktion

Die nach dem oben angegebenen Verfahren ermittelten Halbwertszeiten für $[4-^{14}\text{C}]$ Östradiol-17 β sind in Abbildung 2 dargestellt. Bei einer Schwankung von 60 bis 200 min betrug die mittlere Halbwertszeit für die lebergesunden Vergleichspersonen 120 min; für die Patienten mit Lebercirrhose wurde bei einer Schwankung von 100 bis 247 min eine mittlere Halbwertszeit von 165 min gefunden. Die Differenz konnte statistisch nicht gesichert werden.

Im Hinblick auf die unterschiedlichen Werte erschien es naheliegend zu prüfen, ob bei den Patienten mit Lebercirrhose ein Zusammenhang zwischen der Halbwertszeit für $[4-^{14}\text{C}]$ Östradiol-17 β einerseits und bestimmten Leberfunktionen andererseits bestehen. Abbildung 3 zeigt, daß weder die Aktivität der Alanin-Aminotransferase (SGPT) im Serum noch die Konzentration der γ -Globulin-Fraktion mit der Halbwertszeit für $[4-^{14}\text{C}]$ Östradiol-17 β korreliert werden können.

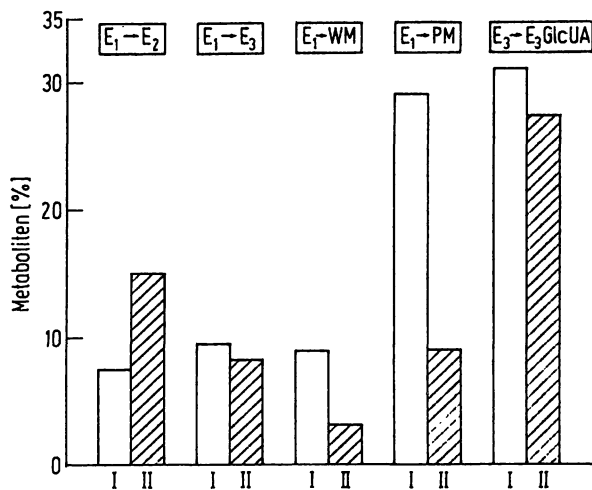


Abb. 4

Mittlere metabolische Umwandlungsraten von $[4-^{14}\text{C}]$ Östron (E_1) und $[4-^{14}\text{C}]$ Östriol (E_2) in den Mikrosomen-Fractionen aus Lebergewebe von 5 männlichen lebergesunden Vergleichspersonen (I) und 5 männlichen Patienten mit Lebercirrhose (II). Die Umwandlungsraten (in %) beziehen sich auf die eingesetzte Substratmenge. Es wurden jeweils $6,2 \mu\text{g}$ Steroid mit der Mikrosomen-Fraktion aus 30 mg Lebergewebe in Gegenwart der entsprechenden Cofaktoren inkubiert; weitere Einzelheiten vgl. Methodik

E_2 = $[4-^{14}\text{C}]$ Östradiol- 17β
 E_3 GlcUA = $[4-^{14}\text{C}]$ Östriol- 16α -monoglucuronid
 WM = wasserlösliche Metaboliten
 PM = proteingebundene Metaboliten

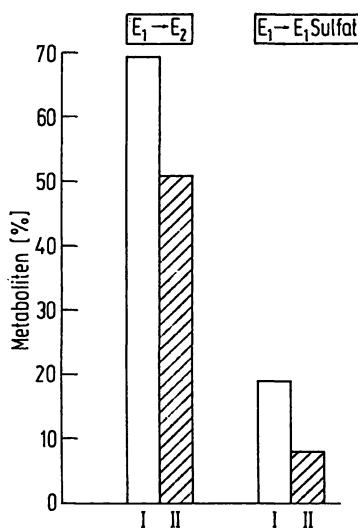


Abb. 5

Mittlere metabolische Umwandlungsraten von $[4-^{14}\text{C}]$ Östron (E_1) in den Cytosol-Fractionen aus Lebergewebe von 5 männlichen lebergesunden Vergleichspersonen (I) und 5 männlichen Patienten mit Lebercirrhose (II). Die Umwandlungsraten (in %) beziehen sich auf die eingesetzte Substratmenge. Es wurden jeweils $6,2 \mu\text{g}$ Steroid mit der Cytosol-Fraktion aus 30 mg Lebergewebe in Gegenwart der entsprechenden Cofaktoren inkubiert; weitere Einzelheiten vgl. Methodik

E_2 = $[4-^{14}\text{C}]$ Östradiol- 17β
 E_1 Sulfat = $[4-^{14}\text{C}]$ Östron-3-sulfat

Inkubationsversuche mit der Mikrosomen-Fraktion

Während der Inkubation von $[4-^{14}\text{C}]$ Östron mit der Mikrosomen-Fraktion der Leber von Patienten mit Lebercirrhose entstand — bezogen auf die eingesetzte Substratmenge — etwa doppelt so viel $[4-^{14}\text{C}]$ Östradiol- 17β wie in den entsprechenden Versuchen mit gesundem Lebergewebe (Abb. 4). Im Gegensatz dazu war die Bildung von wasserlöslichen Metaboliten und insbesondere von proteingebundenen Metaboliten aus $[4-^{14}\text{C}]$ Östron in den Mikrosomen-Fractionen aus cirrhotischem Lebergewebe deutlich vermindert. Die

Hydroxylierung von $[4-^{14}\text{C}]$ Östron zu $[4-^{14}\text{C}]$ Östriol (via Östradiol- 17β oder 16α -Hydroxyöstron) sowie die Konjugierung von $[4-^{14}\text{C}]$ Östriol zu $[4-^{14}\text{C}]$ Östriol- 16α -monoglucuronid war in den Mikrosomen-Fractionen aus gesundem und aus cirrhotischem Lebergewebe etwa gleich groß (Abb. 4).

Inkubationsversuche mit der Cytosol-Fraktion

$[4-^{14}\text{C}]$ Östron wurde unter den hier gewählten Versuchsbedingungen durch die Cytosol-Fraktion der cirrhotischen Leber in geringerem Umfange zu $[4-^{14}\text{C}]$ Östradiol- 17β reduziert als durch die Cytosol-Fraktion von gesunder Leber (Abb. 5). Auch die Konjugierungsrate von $[4-^{14}\text{C}]$ Östron zu $[4-^{14}\text{C}]$ Östron-3-sulfat durch die Cytosol-Fraktion in Gegenwart von PAPS war bei cirrhotischem Lebergewebe erheblich niedriger als bei gesundem Lebergewebe.

Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde festgestellt, daß die Halbwertszeit von $[4-^{14}\text{C}]$ Östradiol- 17β bei männlichen Patienten mit Lebercirrhose im Mittel um etwa 40 min länger ist als bei lebergesunden Vergleichspersonen. Dabei muß allerdings einschränkend bemerkt werden, daß es sich bei den hier angegebenen Halbwertszeiten um „mittlere“ Halbwertszeiten für die Zeit zwischen 120 und 360 min handelt. Da die Meßpunkte bei 120, 240 und 360 min nicht genau auf einer Geraden lagen, hätte man zwei Halbwertszeiten — nämlich eine kürzere (Meßpunkte 120 und 240 min) und eine längere (Meßpunkte 240 und 360 min) — berechnen können. Dieses Verfahren erbrachte jedoch für die vorliegende Fragestellung keine zusätzliche Information, so daß darauf verzichtet werden konnte. Die nicht unerhebliche Differenz zwischen den beiden Halbwertszeiten konnte wegen der relativ großen Schwankungen in beiden Gruppen statistisch nicht gesichert werden.

Wie bereits eingangs erwähnt, hatten SHAVER et al. (13) sowie ALTENBURG und BECKER (14) keine unterschiedlichen Halbwertszeiten bei Lebergesunden und Lebercirrhotikern gefunden; allerdings sollte bereits an dieser Stelle darauf hingewiesen werden, daß die letztgenannten Autoren nach Verabreichung von $[4-^{14}\text{C}]$ Östradiol- 17β die Gesamtradioaktivität im Plasma gemessen haben. Im Gegensatz dazu wurde bei den hier beschriebenen Versuchen die Östradiol-Fraktion papierchromatographisch abgetrennt und ausschließlich die in dieser Fraktion lokalisierte Radioaktivität bestimmt. Dieses Vorgehen gibt eine genauere Auskunft über die tatsächliche Halbwertszeit, da $[4-^{14}\text{C}]$ Östradiol- 17β in nicht unerheblichem Umfang zu $[4-^{14}\text{C}]$ Östron während der Versuchsdauer (360 min) oxidiert wird.

Die Frage, inwieweit der von uns beobachteten Verlängerung der Halbwertszeit von $[4-^{14}\text{C}]$ Östradiol- 17β bei Lebercirrhotikern eine biologische Bedeutung zukommt, läßt sich möglicherweise auf dem Hintergrund der Untersuchungen von VERMEULEN et al. (10) sowie von BAKER et al. (11) beantworten. Diese Autoren fanden erniedrigte metabolische Clearance-Raten für

Östradiol-17 β bei Patienten mit Lebercirrhose — eine Feststellung, die durchaus mit einer verlängerten Halbwertszeit von Östradiol-17 β in Einklang gebracht werden kann.

Die großen Schwankungen der Halbwertszeit für [4-¹⁴C]Östradiol-17 β innerhalb der beiden Gruppen [vgl. auch l. c. (14)] veranlaßten uns, nach möglichen Korrelationen zu anderen Parametern zu suchen. Es gelang nicht, solche Korrelationen nachzuweisen. Dies gilt im einzelnen für folgende Parameter: Klinischer Befund, histologischer Befund, Schweregrad der endokrinen Störungen und klinisch-chemische Untersuchungen. Insbesondere ergab sich kein Zusammenhang zwischen der Länge der Halbwertszeit für [4-¹⁴C]Östradiol-17 β einerseits und der Aktivität der Alanin-Aminotransferase im Serum sowie der Konzentration der γ -Globulin-Fraktion andererseits. Nach ALTENBURG und BECKER (14) soll bei Lebercirrhotikern — im Gegensatz zu Lebergesunden — die Halbwertszeit für radioaktives Östradiol-17 β mit zunehmender Albuminkonzentration (d. h. mit besserer Leberfunktion) abnehmen. — Die im Vergleich zu anderen Autoren etwa doppelt so hohen Werte für die Halbwertszeiten bei den von uns untersuchten lebergesunden Vergleichspersonen haben möglicherweise zwei Gründe: Einmal war die hier verwendete Menge [4-¹⁴C]Östradiol-17 β mit 26,5 μ g/Injektion relativ groß, zum anderen wurde im Plasma nicht die gesamte Radioaktivität, sondern nur die Aktivität der [4-¹⁴C]Östradiol-Fraktion gemessen.

Die Inkubationsversuche mit den Mikrosomen- und Cytosol-Fractionen in Gegenwart der entsprechenden Cofaktoren wurden unter optimalen Reaktionsbedingungen durchgeführt. Diese Reaktionsbedingungen waren in kinetischen Untersuchungen (pH-Kurve, Zeit-Umsatzkurve, Enzym-Umsatzkurve, Substat-Umsatzkurve) ermittelt worden. Eine mögliche Wirkung der Narkose auf die Enzymaktivitäten konnte nicht geprüft werden, da alle Gewebeentnahmen während eines operativen Eingriffes erfolgten; andererseits war in Versuchen mit Ratten, die 2 h einer Neuroleptanalgesie (Fentanyl²) und Dehydrobenzperidol³), Intubation mit N₂O) unterzogen wurden, keine Beeinträchtigung der Aktivität von steroidmetabolisierenden Enzymen nachweisbar (J. BREUER & H. BREUER, unveröffentlichte Versuche).

Die Reduktion von [4-¹⁴C]Östron zu [4-¹⁴C]Östradiol-17 β in Gegenwart von NADPH als Cofaktor war in der Mikrosomen-Fraktion der cirrhotischen Leber etwa doppelt so groß wie in der gesunden Leber, während in der Cytosol-Fraktion der cirrhotischen Leber die Reduktion zu [4-¹⁴C]Östradiol-17 β um etwa 30% verringert war. Für die Beurteilung dieser Beobachtung — und auch der übrigen in-vitro-Versuche — ist folgende Überlegung wichtig. Der mittlere Proteingehalt gleicher Gewebemengen (jeweils 30 mg) betrug

bei der gesunden Leber für die Mikrosomen-Fraktion 1,04 mg und für die Cytosol-Fraktion 2,35 mg; bei der cirrhotischen Leber enthielt die Mikrosomen-Fraktion im Mittel 0,72 mg und die Cytosol-Fraktion im Mittel 1,75 mg Protein. Daraus ergibt sich, daß die Bildungsrate von [4-¹⁴C]Östradiol-17 β — bezogen auf gleiche Proteinmengen — in der cirrhotischen Leber (Mikrosomen- und Cytosol-Fraktion zusammengekommen) insgesamt größer ist als in der normalen Leber. Von besonderem Interesse ist die Feststellung, daß, unabhängig von der Bezugsgröße, die Bildung von wasserlöslichen und proteingebundenen Metaboliten aus [4-¹⁴C]Östron in der Mikrosomen-Fraktion sowie die Sulfatierung von [4-¹⁴C]Östron in der Cytosol-Fraktion bei der cirrhotischen Leber erheblich verringert ist. Im Gegensatz dazu ist das Ausmaß der Bildung von [4-¹⁴C]Östriol und von [4-¹⁴C]Östriol-16 α -monoglucuronid in der cirrhotischen Leber etwa gleich groß wie in der gesunden Leber. Übrigens konnte bei den Patienten, bei denen sowohl die Halbwertszeit von [4-¹⁴C]Östradiol-17 β als auch der Stoffwechsel von [4-¹⁴C]Östron und [4-¹⁴C]Östriol in vitro untersucht wurde, keine Korrelation zwischen den gemessenen Parametern festgestellt werden.

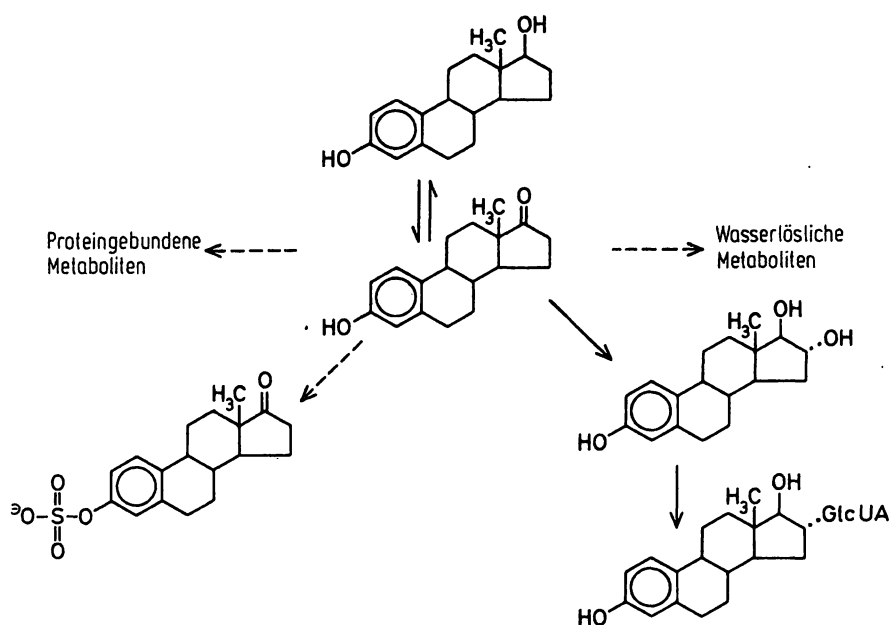
Während die Messungen zur Halbwertszeit mit [4-¹⁴C]Östradiol-17 β durchgeführt wurden, erfolgten die Inkubationsversuche mit [4-¹⁴C]Östron und [4-¹⁴C]Östriol als Substrate. Maßgebend für die Verwendung von [4-¹⁴C]Östron als Substrat war die in früheren Versuchen von uns gemachte Beobachtung, daß Östron bei pH-Werten um 7,4 deutlich stärker umgesetzt wird als Östradiol-17 β . Es war demnach damit zu rechnen, daß mögliche Unterschiede im Stoffwechsel der Östrogene bei Normalpersonen und bei Patienten mit Lebercirrhose in Versuchen mit [4-¹⁴C]Östron deutlicher zum Ausdruck kommen könnten als mit [4-¹⁴C]Östradiol-17 β als Substrat.

Faßt man die oben beschriebenen Versuche zusammen, so ergibt sich folgendes Bild (Abb. 6). Infolge des verringerten Umsatzes von Östron zu sulfatierten, proteingebundenen und wasserlöslichen Metaboliten kommt es in der cirrhotischen Leber zu einem Anstau des Substrates. Gleichzeitig nimmt die Bildung von Östradiol-17 β infolge des vermehrten Substratangebotes zu. Der Nachweis einer erhöhten intrahepatischen Bildungsrate für Östradiol-17 β bei Patienten mit Lebercirrhose deckt sich mit der Beobachtung von VERMEULEN et al. (10), die auch in vivo eine Zunahme der Umwandlung von Östron zu Östradiol-17 β feststellten. Kürzlich haben ENGELHARDT et al. (21) gezeigt, daß 4-Androsten-3,17-dion durch cirrhotisches Lebergewebe vermehrt zu Testosteron reduziert wird. Offenbar ist die Aktivität der hepatischen 17 β -Hydroxysteroid-Oxidoreduktase, die sowohl C₁₈- als auch C₁₉-Steroide angreift, bei Patienten mit Lebercirrhose allgemein erhöht (vgl. 22).

Aus den bisher in der Literatur mitgeteilten Ergebnissen sowie aus unseren eigenen Befunden kann geschlossen werden, daß die Feminisierungserscheinungen

²) 1-N-2-Phenäthyl-4-N-propionyl-anilino-piperidin-dihydrogencitrat, Janssen Pharmaceutica, Beerse, Belgien.

³) 1-3-(4-Fluorbenzoyl)-propyl-4-(2-oxo-1-benzimidazolyl)-1,2,3,6-tetrahydropyridin, Janssen Pharmaceutica, Beerse, Belgien.



bei Männern mit Lebercirrhose nicht auf eine einzelne Störung im Stoffwechsel der Sexualhormone zurückgeführt werden können. Vielmehr handelt es sich hierbei um ein komplexes Geschehen, das alle Reaktionen der Biogenese, des Stoffwechsels und des Abbaus von Östrogenen und Androgenen sowie deren Bindung an Plasma- und Gewebsproteine umfaßt (23, 24). In der hier vorgelegten Arbeit wird gezeigt, daß nicht nur in-vivo-Untersuchungen, sondern auch in-vitro-Studien zum Verständnis der klinisch faßbaren endokrinen Störungen bei Lebercirrhotikern beitragen können.

Danksagung

Die vorliegenden Untersuchungen wurden mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft und des Bundesministeriums für Bildung und Wissenschaft durchgeführt. Den Herren Prof. Dr. A. GÜTGEMANN (Bonn) und Prof. Dr. W. SCHREIBER (Hamburg) sind wir für die Überlassung von Operationsmaterial sowie Herrn Prof. Dr. B. HELPAF (Bonn) für die Beurteilung der histologischen Befunde zu großem Dank verpflichtet. FrI. G. KAESE und Frau M. BORETZKY danken wir für ihre wertvolle Mitarbeit.

Literatur

1. BREUER, J. & BREUER, H. (1970), *Excerpta Medica International Congress Series* 210, 129—130. — 2. BREUER, J. (1970), *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 351, 1299. — 3. LUTTERJOHANN, G. (1970), Dissertation, Medizinische Fakultät, Universität Bonn. — 4. DUNKER, M. (1971), Dissertation, Medizinische Fakultät, Universität Bonn. — 5. ADLERCREUTZ, H. (1970), *J. Endocrinol.* 46, 129—163. — 6. ADLERCREUTZ, H. & SCHAUMAN, K. O. (1964), *Acta Endocr. (Kbh.)* 46, 230—234. — 7. BLOOMBERG, B. N., MILLER, K., KEELEY, K. J. & HIGGINSON, J. (1958), *J. Endocrinol.* 17, 182—190. — 8. BROWN, J. B., CREAN, G. P. & GINSBERG, J. (1964), *Gut* 5, 56—59. — 9. KORENMAN, ST. G., PERRIN, L. E. & MCCALLUM, T. (1969), *J. Clin. Invest.* 48, 45a. — 10. VERMEULEN, A., MUSSCHE, M. & VERDONCK, L. (1972), *Excerpta Medica Congress Series* 256, 123. — 11. BAKER, H. W., DULMANIS, A., HUDSON, B., PAULSEN, A. C., PURCELL, N. & WOJNARSKI, S. (1972), *Excerpta Medica Congress Series* 256, 131. — 12. RAKOFF, A. E., CANTAROW, A., PASCHKIS, K. E. & HANSEN, L. P. (1944), *Fed. Proc.* 3, 38. — 13. SHAVER, J. C., ROGINSKI, M. S. & CHRISTY, N. P. (1963), *Lancet* II, 335—336. — 14. ALTENBURG, K. & BECKER, K. (1971), *Acta Hepato-Splenol.* 18, 95—103. — 15. BREUER, J., SCHNEIDER, H. TH. & BREUER, H. (1970), *diese Z.* 8, 626—631. — 16. GREGORY, J. D. (1962), in: *Methods in Enzymology*, hrsg. COLOWICK, S. P. & KAPLAN, N. O., Academic Press, New York, Vol. 5, 966—968. — 17. MITCHELL, F. L. & DAVIES, R. E. (1954), *Biochem. J.* 56, 690 bis 698. — 18. KNUPPEN, R. (1962), *Z. Vitamin-, Hormon- u. Fermentforsch.* 12, 355—401. — 19. NEHER, R. & WETTSTEIN, A. (1951), *Helv. Chim. Acta* 34, 2278—2285. — 20. BRADSTREET, R. B. (1965), *The Kjeldahl Method for Organic Nitrogen*, Academic Press, New York. — 21. ENGELHARDT, D., UNTERBURGER, P. & KARL, H. J. (1972), *Acta Endocr. (Kbh.) Suppl.* 159, 18. — 22. BREUER, H., BREUER, J. & LISBOA, B. P. (1968), in: *Testosterone, Proceedings of the Workshop Conference*, 20.—22. 4. 1967 at Tremsbüttel, ed. Tamm, J., Thieme, Stuttgart, 76—79. — 23. BREUER, J., SCHNEIDER, H. TH. & BREUER, H. (1970), *Res. Steroids* 4, 109—115. — 24. GALVAO-TELES, A., ANDERSON, D. C., BURKE, C. W., MARSHALL, J. C., CORKER, C. S., BROWN, R. L. & CLARK, M. L. (1973), *Lancet* I, 173—177.

Prof. Dr. H. Breuer
53 Bonn 1
Venusberg